

*Nicolás Douglas
Pedro Olmedo
Carlos Roberto Douglas
Osmar Monte*

Núcleo de Pesquisas Biológicas da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Metodista de São Paulo (ND, PO & CRD); e Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (OM), SP.

*Recebido em 15/07/05
Revisado em 23/01/06 e 19/04/06
Aceito em 30/05/06*

RESUMO

O objetivo foi verificar a influência da deficiência dos hormônios tireoideanos induzida por propiltiouracil (PTU) na mucosa gengival do rato, analisando bioquimicamente as proteínas totais, colágeno (hidroxiprolina) e população celular (DNA). Foram utilizados 50 ratos machos da cepa Sprague-Dawley, separados em 2 grupos: propiltiouracil (PTU) (10 mg/d i.p.), e controle (C), durante 10 semanas. As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry, a hidroxiprolina pelo método de Newman e DNA pelo método de Burton. Observou-se diminuição das proteínas totais no grupo PTU (PTU= $41,23 \pm 24,05$; C= $63,36 \pm 18,05$); não houve diferença na hidroxiprolina e DNA (PTU= $2,18 \pm 1,48$; C= $2,29 \pm 1,51$) e (PTU= $0,33 \pm 0,19$; C= $0,46 \pm 0,31$). Conclui-se que o tratamento com PTU diminui o conteúdo de proteínas totais na mucosa gengival do rato, provavelmente pela diminuição da síntese protéica, sem alteração do colágeno e da população celular. (Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/5:926-929)

Descritores: Hipotireoidismo; Propiltiouracil; Gengiva; Proteínas; Colágeno; DNA

ABSTRACT

Influence of Propiltiouracil-Induced Hypothyroidism on Rat Gingival Mucosa.

This work aimed at verifying the influence of propiltiouracil (PTU)-induced thyroid hormone deficiency on gingival mucosa of young male rats, measuring total protein concentration, collagen content and DNA concentration as indices of cellular population. Fifty Sprague-Dawley rats were used. The animals were grouped in: PTU-treated (i.p. 10 mg/d) and control rats (C). The experience was maintained for a period of 10 weeks. Total protein content of gingival mucosa tissue was determined by the Lowry method; hydroxyprolin rate, as prototype aminoacid of collagen, was determined using the Newman method, and DNA concentration was measured by Burton's methodology. The results showed decreased amounts of PTU-treated rats gingival total protein content (PTU= 41.23 ± 24.05 vs. C= 63.36 ± 18.05); no alterations were seen in hydroxyprolin concentration neither in DNA content of PTU treated rats, respectively (PTU= 2.18 ± 1.48 vs. C= 2.29 ± 1.51) and (PTU= 0.33 ± 0.19 vs. C= 0.46 ± 0.41). Thus, PTU treatment promotes a decrease in total protein content of rat gingival mucosa that may be interpreted as a decrease in protein synthesis induced by the hypothyroid condition, but with no alteration either in collagen or nucleic acid rates. (Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/5:926-929)

Keywords: Hypothyroidism; Propiltiouracil; Gingiva; Proteins; Collagen; DNA

A GLÂNDULA TIREÓIDE, ATRAVÉS de seus hormônios, controla várias funções orgânicas, como o desenvolvimento e diferenciação dos tecidos e regulação do metabolismo energético (1,2). As estruturas orais não são exceção, estando também sob o controle endócrino da tireóide. Contudo, os conhecimentos acerca da influência dos hormônios tireoideanos sobre os tecidos da boca não estão suficientemente estudados, havendo apenas abordagens fracionadas. Além disso, determinadas periodontopatias crônicas, tanto inflamatórias como degenerativas, são observadas no rato adulto com hipotireoidismo (3).

Sob o ponto de vista histológico, foi demonstrado que no hipotireoidismo experimental observa-se atrofia de todas as camadas da mucosa oral, havendo redução do conteúdo protéico (4) e diminuição do tamanho dos núcleos das células do epitélio gengival em camundongos (5). Inversamente, as proteínas totais da mucosa bucal de células humanas cultivadas *in vitro* aumentam nas primeiras 24 horas quando colocado TSH no meio de cultura (6).

O efeito dos hormônios tireoideanos no metabolismo das proteínas é complexo, pois a triiodotironina agiria, estimulando tanto a síntese quanto a degradação das proteínas tissulares e plasmáticas. No hipotireoidismo, tanto a síntese quanto a degradação de proteínas estão diminuídas, mas predomina a diminuição da síntese protéica. Isto poderia promover um retardo no crescimento corporal, tanto pela perturbação na síntese de proteínas como por ausência moduladora da ação dos hormônios tireoideanos na secreção de outros hormônios, como o hormônio do crescimento (GH), bem como de fatores de crescimento, IGF-I em particular (1-7).

A gengiva é de origem ectodérmica, recobre o processo alveolar e circunda a região cervical do dente, sendo integrante do denominado periodonto de proteção. O epitélio gengival corresponde ao tipo escamoso pluriestratificado e se caracteriza pela presença de células queratinizadas ou paraqueratinizadas; recobre, desta forma, a matriz de natureza conjuntiva (8).

O fibroblasto é o responsável pela síntese de colágeno, fibronectina, fibras elásticas e glicosaminoglicanos, sendo o colágeno (tipo I) o componente fundamental da matriz extracelular do tecido conjuntivo da gengiva (9).

A influência do hipotireoidismo provocada por PTU, na mucosa gengival, pode ser determinada sob o ponto de vista bioquímico, analisando-se o conteúdo de proteínas totais, colágeno (através do conteúdo de hidroxiprolina) e a população celular (através do conteúdo de DNA).

MÉTODOS

O trabalho foi realizado em 50 ratos machos da cepa Sprague-Dawley, de três meses de idade, mantidos sob condição padrão de biotério, com temperatura de 23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), umidade ambiental de 55% e ciclo luz-escurecimento de 12 horas, alimentados com dieta padrão e água *ad libitum*, mantidos em gaiolas coletivas de 5 animais, durante 10 semanas. A função tireoideana foi avaliada medindo-se a concentração plasmática do T₃ e T₄, pelo controle do peso corporal e ingestão alimentar.

Os animais foram distribuídos em 2 grupos: Controle (n= 20) e Propiltiouracil (PTU) (n= 30). Os do grupo controle receberam injeções diárias de 0,5 mL de soro fisiológico por via intraperitoneal. Os animais do grupo PTU receberam injeções diárias de 0,5 mL contendo 10,0 mg de PTU (propiltiouracil 100 mg, Pharmacia Brasil Ltda.) diluído em solução alcoólica 7%, por via intraperitoneal (10).

A mucosa gengival foi retirada da região de incisivos superiores (aproximadamente 20 mg), e nestas amostras foram mensuradas proteínas totais, hidroxiprolina e DNA.

Depois de retiradas e pesadas, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio de 10 mL contendo 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%, e colocadas em estufa a 100°C durante 30 minutos, para hidrólise do tecido.

A determinação das proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico de Lowry (11), na hidroxiprolina foi utilizado o método calorimétrico de Neuman e Logan (12) e o DNA pelo método de difenilamina de Burton (13), utilizando-se espectrofotômetro Turner para leitura com comprimento de onda de 530, 540 e 600 nm respectivamente. Os valores foram expressos em mg/g de tecido.

A medida plasmática de T₃ e T₄ foi realizada por radioimunoensaio (Kit Cis bio internacional - USA). Limite de detecção 0,1 ng/mL e 2,5 ng/mL, CV intraensaio 6,6% e 4,0% para T₃ e T₄ respectivamente.

A análise estatística utilizada foi o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Dos resultados obtidos, verificamos que a concentração de proteínas totais na mucosa gengival apresenta diminuição significativa ($p < 0,05$) no grupo PTU (tabela 1). A concentração de hidroxiprolina e DNA na mucosa gengival não apresenta diferenças estatísticas ($p = 0,05$) entre os grupos estudados (tabela 2). O peso corporal mostra diferença significativa ($p < 0,05$)

entre os pesos iniciais e finais de cada grupo, sendo que o grupo PTU apresenta taxa de ganho ponderal inferior. A ingestão alimentar foi semelhante nos 2 grupos estudados. As concentrações plasmáticas de T_3 e T_4 são menores no grupo PTU ($p < 0,05$) (tabela 3).

DISCUSSÃO

A análise dos resultados da evolução do peso corporal e da concentração de T_3 e T_4 mostra que os animais tratados com PTU encontram-se em hipotireoidismo.

As proteínas totais da mucosa gengival encontram-se diminuídas no grupo PTU, provavelmente devido à redução da síntese, e não do aumento do catabolismo (1-7); isto provavelmente ocorre devido a o T_3 se ligar ao TRE (elemento responsivo à tiroxina), que representa a área promotora dos genes que induzem uma maior taxa de síntese de proteínas tissulares (1).

Além do hipotireoidismo, caberia estabelecer que outro tipo de fator poderia intervir na diminuição da síntese protéica, por exemplo a participação do fator mecânico, que representa um mecanismo de certa importância

Tabela 1. Concentração de proteínas totais da mucosa gengival (mg/g de tecido) em ratos hipotireóides tratados com propiltiouracil (PTU) e controles.

Grupos	n	Média ± DP
Controle	20	63,36 ± 18,05
PTU	30	41,23 ± 24,05 *

* $p < 0,05$ entre o grupo PTU e grupo controle
n= número de amostras; DP= Desvio-Padrão

Tabela 2. Concentração de hidroxiprolina e DNA (mg/g de tecido) em ratos hipotireóides tratados com propiltiouracil (PTU) e controles.

Grupos	n	Média ± DP Hidroxiprolina	Média ± DP DNA
Controle	20	2,29 ± 1,5	10,46 ± 0,31
PTU	28	2,18 ± 1,48	0,33 ± 0,19

n= número de amostras; DP= Desvio-Padrão

Tabela 3. Concentração plasmática de T_3 (ng /dL) e T_4 (mg /dL).

Grupos	n	Média ± DP	Média ± DP
		T_3	T_4
Controle	20	90,03 ± 9,77	6,74 ± 0,21
PTU	28	4,05 ± 0,23	0,12 ± 0,01 *

* $p < 0,05$ entre o grupo PTU e grupo controle
n= número de amostras; DP= Desvio-Padrão

nas estruturas bucais. A gengiva, quando submetida a forças mecânicas do tipo pressóricas, pode se adaptar, aumentando a síntese de proteínas, embora na experiência atual não se notou variações do teor de hidroxiprolina (colágeno), que deveria ser o elemento mais alterado se fosse efetivamente o mecanismo pressórico local o mais importante (10-14). Colaborou com esse fato o achado de que os dois grupos tiveram a mesma ingestão alimentar e, portanto, os mesmos estímulos mecânicos sobre a gengiva.

O metabolismo do colágeno medido através da hidroxiprolina não apresentou diferença entre os dois grupos, possivelmente pela pouca influência dos hormônios tireoideanos no controle de sua síntese na gengiva. De acordo com Ham & Amar (15), os fibroblastos do ligamento periodontal (formado principalmente de fibras colágenas) são controlados em especial pela IGF-I, que acarreta menor apoptose de suas células, o que determina maior sobrevivência celular e *turnover* de colágeno, e poderia levar a uma redução do conteúdo do mesmo, o que não se observa na gengiva onde os fibroblastos gengivais não são controlados por IGF-I.

O conteúdo de DNA na mucosa gengival é similar nas duas condições experimentais, mostrando que não houve modificação na população celular. Isto pode indicar que a diminuição das proteínas totais seria por diminuição de sua síntese, que é induzida pelo déficit dos hormônios tireoideanos e não pela alteração da população celular.

Podemos concluir que a mucosa gengival seria sensível ao déficit de hormônios tireoideanos, havendo redução no conteúdo de proteínas totais, por menor síntese protéica. As variações das proteínas totais não poderiam ser atribuídas à variação da população celular da gengiva nem ao conteúdo de colágeno, visto que estes parâmetros são semelhantes ao grupo controle.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Casemiro Fernando Leite, pelo auxílio na análise bioestatística dos resultados. Aos técnicos do Núcleo de Pesquisas Biológicas da UMESP, Srs. Gustavo Vieira Bezerra, Eduardo Lemos e Adriano Vieira Bezerra, pela ajuda técnica na realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Larsen PR, Davies TF, Hay ID. The thyroid gland. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PE. **Williams' textbook of endocrinology**. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998. pp. 389-515.

2. Lazar MA. Thyroid hormone action: a binding contract. **J Clin Invest** 2003;112(4):497-9.
3. Schneider LC. Periodontal disease in hypothyroidism adult rats. **Arch Oral Biol** 1969;14:1169-75.
4. Attia M, Soliman MM, George Y. Effect of thyroid hormones on the oral mucosa and submucosa. **Egypt Dent J** 1978;24:139-51.
5. Navarro JM, Perdomo AC, Gómez GE, Rodriguez RMA, Navarro PR. Efectos de las variaciones hormonales sobre el epitelio gengival. II. Efectos de la deprivación tiroidea (Mediante un hipotireoidismo químico). **Av Odontoesomatol** 1986;2:171-7.
6. Coleman H, Benghuzzi H, Tucci M, Cason Z. The effects of thyroid and reproductive hormones on the viability of human buccal epithelium. **Biomed Sci Instrum** 2001;37:143-8.
7. Stivaletti VLG, Douglas CR, Bydlowski SP. Thyroidectomy promoting changes on lipid and protein content from aorta of low protein-feed rat. **IRCS Med Sci** 1981;9:1119-23.
8. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Mucosa bucal. In: Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. **Anatomia, embriologia e histologia bucal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. pp. 220-48.
9. Buduneli N, Atilla G, Guner G, Oktay G. Biochemical analysis of total collagen content and collagen types I, III, IV, V and VI in gingiva of various periodontitis categories. **J Int Acad Periodontol** 2001;3:1-6.
10. Douglas NA, Stivaletti VLG, Douglas CR. Influência do tipo de dieta e da glândula tireóide no ligamento periodontal do rato. **Rev Odonto** 1997;1:26-31.
11. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951;193:265-75.
12. Newman RE, Logan MA. The determination of hydroxiprolin. **J Biol Chem** 1950;184:299-313.
13. Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of the desoxyribonucleic acid. **Biochem J** 1956;62:315-23.
14. Ramirez-Yañez GO, Daley TJ, Symons AL, Young WG. Incisor desocclusion in rats affects mandibular condylar cartilage at the cellular level. **Arch Oral Biol** 2004;49:393-400.
15. Han X, Amar S. IGF-1 signaling enhances cell survival in periodontal ligament fibroblast vs. gingival fibroblasts. **J Dent Res** 2003;82:454-9.

Endereço para correspondência:

Nicolás Douglas
Rua Caramuru 1438, apto 63-B
04138-002 São Paulo
E-mail: nicolasd@uol.com.br